



(19)

(11) Publication number:

09151137 A

Generated Document.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(21) Application number: **07314278**(51) Intl. Cl.: **A61K 38/21 A61K 38/21 A61K 38/21
A61K 38/21**(22) Application date: **01.12.95**

(30) Priority:

(43) Date of application
publication: **10.06.97**(84) Designated contracting
states:(71) Applicant: **TORAY IND INC**(72) Inventor: **SANO EMIKO**

(74) Representative:

**(54) MEDICINE FOR
INHIBITING
MULTIPLICATION OF
SMOOTH MUSCLE CELL**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To prepare a smooth muscle cell proliferation-inhibiting medicine useful for preventing and treating cell proliferative vascular lesions such as vascular restenosis, arteriosclerosis and peripheral artery occlusion by using, a protein having an antiviral activity as a specific substance.

SOLUTION: Interferon (referred to as IFN) is used as an active ingredient. An IFN, type α or β , or a consensus type or hybrid type IFN containing its amino acid sequence may be used as the IFN. Natural type β -IFN is especially preferable. Since the IFN can inhibit the proliferation of aortic smooth muscle cells, the IFN can be used as a medicine for preventing and treating various diseases caused by the abnormal proliferation of the vascular smooth muscle cells e.g. cell

proliferative vasculitis such as vascular restenosis after PTCA, intima hyperplasia after arteriosclerosis or ischemic angiopathy, and vasculitis found in peripheral artery occlusion, periarteritis nodosa or transplanted organs, and further as a vascular wall hyperplasia-inhibiting agent.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-151137

(43) 公開日 平成9年(1997)6月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/21	ABN		A 6 1 K 37/66	ABNG
	ABE			ABE
	ABX			ABX
	AED			AED

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全6頁)

(21) 出願番号 特願平7-314278

(22) 出願日 平成7年(1995)12月1日

(71) 出願人 000003159

東レ株式会社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(72) 発明者 佐野 恵海子

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内

(54) 【発明の名称】 平滑筋細胞増殖抑制剤

(57) 【要約】

【課題】 PTCA後の血管再狭窄、動脈硬化、虚血性血管障害後の内膜肥厚、末梢動脈閉塞、結節性動脈周囲炎又は移植臓器において見られる血管炎などの細胞増殖性血管炎に対する予防・治療薬並びに血管壁肥厚抑制剤を提供することにある。

【解決手段】 インターフェロンを有効成分とする平滑筋細胞増殖抑制剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターフェロンを有効成分とする平滑筋細胞増殖抑制剤。

【請求項2】 平滑筋細胞が血管平滑筋細胞である請求項1記載の平滑筋細胞増殖抑制剤。

【請求項3】 血管壁肥厚を抑制する請求項1又は2記載の平滑筋細胞増殖抑制剤。

【請求項4】 細胞増殖性血管病変に対する予防・治療剤である請求項1記載の平滑筋細胞増殖抑制剤。

【請求項5】 細胞増殖性血管病変が、経皮的冠状動脈形成術後の血管再狭窄、動脈硬化、虚血性血管障害後の内膜肥厚、末梢動脈閉塞、結節性動脈周囲炎又は移植臓器において見られる血管炎である請求項4記載の平滑筋細胞増殖抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はインターフェロン（以下、IFNと略す）を有効成分とする平滑筋細胞増殖抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、日本人の死亡率の上位を占める脳卒中、心臓病の主要原因は、血管の老化、損傷、機能低下と考えられている。例えば、冠動脈硬化症は、動脈壁に加えられるさまざまな刺激・傷害による内皮細胞の脱落や機能障害に端を発し、マクロファージ、リンパ球の内皮下への浸潤と脂質の取り込みによる泡沫細胞化、内皮細胞傷害部位に対する血小板付着とその活性化に誘発される平滑筋細胞の遊走・増殖によるプラーク形成へと進む。プラークが破綻し、潰瘍を形成すると血栓が生じ、心筋梗塞などの危険な症状に至る。動脈が傷害されたあとに起こる血管壁の細胞増殖性の変化は内膜肥厚につながり、病態の悪化をもたらす。

【0003】血管が物理的傷害を受けた後に起こる細胞増殖性の血管病変の代表例としては、経皮的冠状動脈形成術（PTCA）施行後の血管再狭窄を挙げることができる。PTCAは狭心症・心筋梗塞などの虚血性心疾患の治療法の一つであり、開胸手術をすることなく経皮的にバルーン・カテーテルを血管内に挿入し、冠動脈狭窄部位を拡張させて治療するものである。1977年にGruentzigにより臨床導入されて以来、PTCAはそれまでの外科的な血管バイパス術に代わり、虚血性心疾患の代表的治療法として広く施行されてきた。これまでのPTCA施行技術上の進歩および経験の蓄積により、PTCA施行直後の虚血症状改善率は90%を越え、かつ、死亡例や心筋梗塞発作誘発などの副作用の発現も非常に少なく、優れた治療法として評価されている。

【0004】ところがPTCA施行に成功した症例の中でも、その後同じ部位で血管が再狭窄を起こす症例が約30-40%程度あり、その場合再度PTCAを施行するか血管バイパス術を行わざるを得ず、これが臨床上最

大の問題点となっている。PTCA後再閉塞を起こし死亡した症例の剖検結果では、PTCAにより血管が拡大した部位は、細胞増殖性の内膜肥厚により再閉塞していることが明らかにされている（Human Pathol. 20, 477-485, 1989）。PTCA後に生ずる血管壁内膜肥厚は、血管の内皮傷害が原因であると考えられ、血管中膜層から平滑筋細胞が遊走し、内膜層で増殖を重ねることによって、内膜肥厚が形成されると報告されている。しかし、この現象は、生理学、薬理学的にはほとんど解明されておらず、血小板由来の12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸（12-HETE）が培養平滑筋細胞の遊走作用を促進することや、血小板由来成長因子（PDGF）が平滑筋細胞の遊走や増殖促進作用を有することが知られているのみである。しかしながら、実際にこれらの因子が動脈硬化性の血管内膜の肥厚やPTCA後の再肥厚に直接関与しているかどうかを確かめた報告はなく、これらの阻害あるいは拮抗物質が血管の内膜肥厚を抑制したとの知見も今のところない。

【0005】現在までに、PTCA後再狭窄率を低下させるために全身薬物療法、例えば抗血小板剤、血液凝固阻止薬、コルチコステロイド、細胞増殖抑制、トロンボキサンA2阻害剤、脂質低下剤およびカルシウムチャンネル遮断薬なども試みられてきたが、いずれの薬剤も実際に臨床で検討した結果では、血管再狭窄に対する明らかな有用性は認められていない。血中に存在する生理活性ペプチド、アンジオテンシンII（Ang II）が、強力な血圧上昇作用を有することは広く知られているところであり、カプトプリル、セタプリル、シラザプリルなどのAngII合成阻害剤が、すでに臨床において高血圧治療薬として多用されている。その後、パウエルらは、ラットにAngII合成酵素（ACE）阻害剤を予め投与しておくことでバルーンにより総頸動脈の内皮を剥離し傷害を与えた後の内膜肥厚が抑制されることを報告した（Science, 245, 186-188, 1989）。さらにナフティランらはラット血管平滑筋細胞を用いて、AngIIが増殖促進に働くことを示した（Hypertension 13, 706-711, 1989 および J. Clin. Invest. 83, 1419-1424, 1989）。これらの事実からAngIIは従来知られている血圧上昇作用以外にも、動脈が傷害された後に起こる血管壁の細胞増殖性変化にも関与していると考えられるようになった。

【0006】その後、代表的なACE阻害剤であるシラザプリルを用いて、595名のPTCAを施行した患者を対象に血管再狭窄に対する防止効果、安全性などの有効性についてヨーロッパにおいて検討された（Circulation, 86(1), 100-110, 1992）。しかしながら、その結果は、平均血管腔径および虚血性症状の発現頻度において対照群と統計学的に有意差が認められなかった。

【0007】この状況は、同質な病理像・臨床症状を示す動脈硬化、末梢動脈閉塞、結節性動脈周囲炎又は移植臓器において見られる血管炎などの細胞増殖血管炎並び

に血管壁肥厚についても同様である。なお、移植臓器において見られる細胞増殖性血管炎とは、各種不全臓器に対する移植手術後の慢性期に出現する。血管内膜の肥厚を特徴とする細胞増殖性血管病変であり、移植手術時の血管損傷ならびに拒絶反応による免疫・炎症機構の活性化が原因となって生起する。とりわけ心臓移植後早期に多く発現する冠動脈硬化は、accelerated coronary arteriosclerosisと呼ばれ、臓器移植の予後あるいは生存年数を決定付ける重要な因子であるのと同時に、有効な予防・改善薬のないことが実施上あるいは普及上での重要な問題となっている。

【0008】このように生命にもかかわる重篤な疾患ある細胞増殖性血管病変に対し有効な予防・治療薬がないのは、病変が複雑な機構が絡み合っているからであり、新しい作用機構を持つ予防・改善薬の創出が望まれている。

【0009】IFNは抗ウイルス活性を持つ蛋白質として発見され、すでに肝炎や脳腫瘍、悪性黒色腫などの悪性腫瘍の治療薬として臨床に供されている。その後の研究からIFNには細胞増殖抑制作用や抗腫瘍活性、免疫系の活性化など生体防御機構に係わる多面的な生物活性を有することが報告され、各分野の臨床への適用の可能性が期待されている。IFNは、現在、抗原性の違いから α 、 β 、 γ および ω の4型に分類されており、各タイプのIFNは抗ウイルス活性には大差はないが、産生細胞や誘発条件、また、遺伝子や構造特性、レセプターなどに違いが見られる。このようにIFNは多面的な生物活性を有する物質であるが、血管病変や虚血による組織傷害など循環器疾患分野における作用について検討されたものは少ない。

【0010】本発明は、PTCA後血管再狭窄、動脈硬化、虚血性血管傷害後の内膜肥厚、末梢動脈閉塞、結節性動脈周囲炎、又は移植臓器において見られる血管炎などの細胞増殖性血管病変並びに血管壁肥厚に対し、血管平滑筋細胞の増殖を抑制する因子を治療として開発すべきことが課題として上げられる。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明はこの課題を解決すべく産業上及び医療上有用な平滑筋細胞増殖抑制剤を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記の課題は、以下の本発明により達成される。すなわち本発明は、IFNを有効成分とする平滑筋細胞増殖抑制剤である。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明が対象とする疾患は、平滑筋細胞の増殖が関与している、PTCA後血管再狭窄、動脈硬化、虚血性血管傷害後の内膜肥厚、末梢動脈閉塞、結節性動脈周囲炎、又は移植臓器において見られる血管炎などの細胞増殖性血管病変並びに血管壁肥厚に伴

う疾患である。

【0014】IFNはすでに肝炎や脳腫瘍、悪性黒色腫などの悪性腫瘍に対する治療薬として認可されているが、本発明に用いられるIFNは、 α および β 型、あるいはこれらのアミノ酸配列を含むコンセンサス型や、ハイブリッド型のいずれも使用することができる。また由来も天然型、遺伝子組換え型、化学合成型のいずれでも良いが、天然型IFN β が好ましく用いられる。

【0015】天然型IFN β の生産では、線維芽細胞およびその樹立株化細胞が好んで用いられる。遺伝子組換え型技術を利用してIFNを調製する場合には、宿主細胞として、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞、マウスC127細胞などの哺乳動物細胞、カイコ、夜盗蛾などの昆虫細胞、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物などを用いることができる。さらに、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシなどを用いることができる。

【0016】このようにして調製されたIFN β は、原料となる細胞培養上清、虫体抽出液、菌抽出液、生体抽出液から種々のクロマトグラフィーにより、精製分離することができる。用いるクロマトグラフィーは、IFN β に親和性を有するものであればいずれでも良いが、例えば、二酸化ケイ素（シリカ）やリン酸カルシウムを吸着素材とするカラム、ヘパリンや色素、疎水量をリガンドとするカラム、金属キレートカラム、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムなどである。

【0017】IFNは、大動脈平滑筋細胞の増殖を抑制することから、血管平滑筋細胞の異常増殖を原因とする様々な疾患、例えば、PTCA後の血管再狭窄、動脈硬化、虚血性血管障害後の内膜肥厚、末梢動脈閉塞、結節性動脈周囲炎又は移植臓器において見られる血管炎などの細胞増殖性血管炎に対する予防薬、治療薬、および血管壁肥厚抑制剤になりうる。

【0018】本発明に用いるIFN β は、そのまましくは自体公知の薬理学に許容される担体、賦形剤などと混合した医薬組成物として、経口または非経口に投与することができる。経口投与のための剤形としては、具体的には錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられる。かかる剤形は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、ラクトース、マルトース、サッカロース、澱粉、ステアリン酸マグネシウムなどが挙げられる。

【0019】非経口投与のための剤形としては、例えば、点眼剤、軟膏剤、注射剤、湿布剤、塗布剤、座薬、経鼻吸入剤、経肺吸入剤、経皮吸入剤などが挙げられる。溶液製剤は、自体公知の方法、例えば、IFNを通常、注射剤に用いられた無菌の水溶液に溶解、あるいは抽出液に懸濁、さらに乳化してリポソームに包埋させた

状態で調製され得る。固体製剤としては、自体公知の方法、例えば、IFN β にマンニトール、トレハロース、ソルビトール、ラクトース、グルコースなどを賦形剤として加え、凍結乾燥物として調製され得る。さらにこれを粉体化して用いることもできるゲル化剤としては、自体公知の方法、例えば、IFN β をグリセリン、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などの増粘剤や多糖に溶解した状態で調製され得る。

【0020】いずれの製剤においても、安定化剤としてヒト血清アルブミン、ヒト免疫グロブリン、 α 2マクログロブリン、アミノ酸などを添加することができ、また、分散剤あるいは吸収促進剤としてIFN β の生理活性を損なわない範囲でアルコール、糖アルコール、イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤などを添加することができる。また、微量金属や有機酸塩も必要に応じて加えることができる。

【0021】本発明に用いるIFNは、有効成分もしくは有効成分の一つとして、単独または作用機構の異なる他の薬剤と合わせて使用することができる。例えば、内皮細胞特異的増殖因子(VEGF)などと併用することにより相乗的な効果が期待できる。VEGFは、すでにPTCA後の血管再狭窄の改善に有効性が報告されているが(Callow, A.D. et al. Growth Factors, 10, 223-228, 1994)その作用機構はIFNと異なる。つまり、VEGFの再狭窄予防効果は、内皮細胞の特異的増殖活性とPGI₂産生増強作用によることが考えられるが、IFNにはこれら作用が認められない。IFNは実施例に示したように血管平滑筋細胞の増殖を抑制し、内膜肥厚の予防・改善に係わる。

【0022】こうして得られた精製IFN β 標品は、上述した剤形に製剤化され平滑筋細胞増殖抑制剤として用いることができる。投与量は、患者の年齢、体重、投与対象疾患、症状、投与形態、投与ルートなどに応じて適宜決定されるが、一般には1-1000万単位/日、好ましくは10-600万単位/日の範囲で投与される。

【0023】

【実施例】次に、実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、これらに限定されるものではない。

【0024】実施例1

各種IFNおよび各種増殖因子のヒト大動脈平滑筋細胞の増殖に対する作用を調べ図1に示した。ヒト大動脈平滑筋細胞を24穴マイクロプレートに10%FCSを含むS-BM培地(クラボウ)を用いて1万個/ウエルで

接種し、細胞が十分に接着した6時間後に各濃度のbFGF、PDGF-BB、IFN α 、IFN β およびIFN γ を含むイーグルMEM培地(無血清)に培地交換した。37℃48時間培養し、増殖した細胞数をコールターカウンターで測定した。これより、IFNは対照に比べて平滑筋細胞の増殖を有意に抑制した。また、増殖抑制作用はIFN α およびIFN β が特に強かった。比較のために用いた増殖因子は、いずれも平滑筋細胞に対して増殖促進作用を示した。グラフは3回の繰返し実験のうちの代表例を示した。カラムおよびバーは平均 \pm S.E.(n=4)を示している。統計処理はStudent T Testにより実施した。

【0025】実施例2

IFN β と増殖因子(VEGFおよびbFGF)を用いて、内皮細胞のPGI₂産生に及ぼす影響を検討した。コラーゲンコートした24穴プレートに、10%FCSを加えたM199培地を用いて内皮細胞を5万個/穴で接種し、細胞が接着し十分にコンフルエントになったのを確認後、各濃度のIFN β と増殖因子を添加した2%FCSを含むM199培地に変えて24時間培養した。培養上清中のPGI₂(安定な加水分解物6-Keto-PG-F1 α として測定)産生量をELISA法(Cayman Chemical)で測定した結果を図2に示した。IFN β は内皮のPGI₂産生を増強しないが、VEGFは濃度依存的に産生を増強し、bFGFは産生を抑制した。IFNの平滑筋細胞増殖抑制作用は、PGI₂の誘導によるものではないことが判明した。血管内膜肥厚を抑制する目的でIFNを使用するときは、作用機構の異なる他の増殖抑制剤あるいは内皮細胞保護剤を併用することにより相乗効果が期待できる。

【0026】

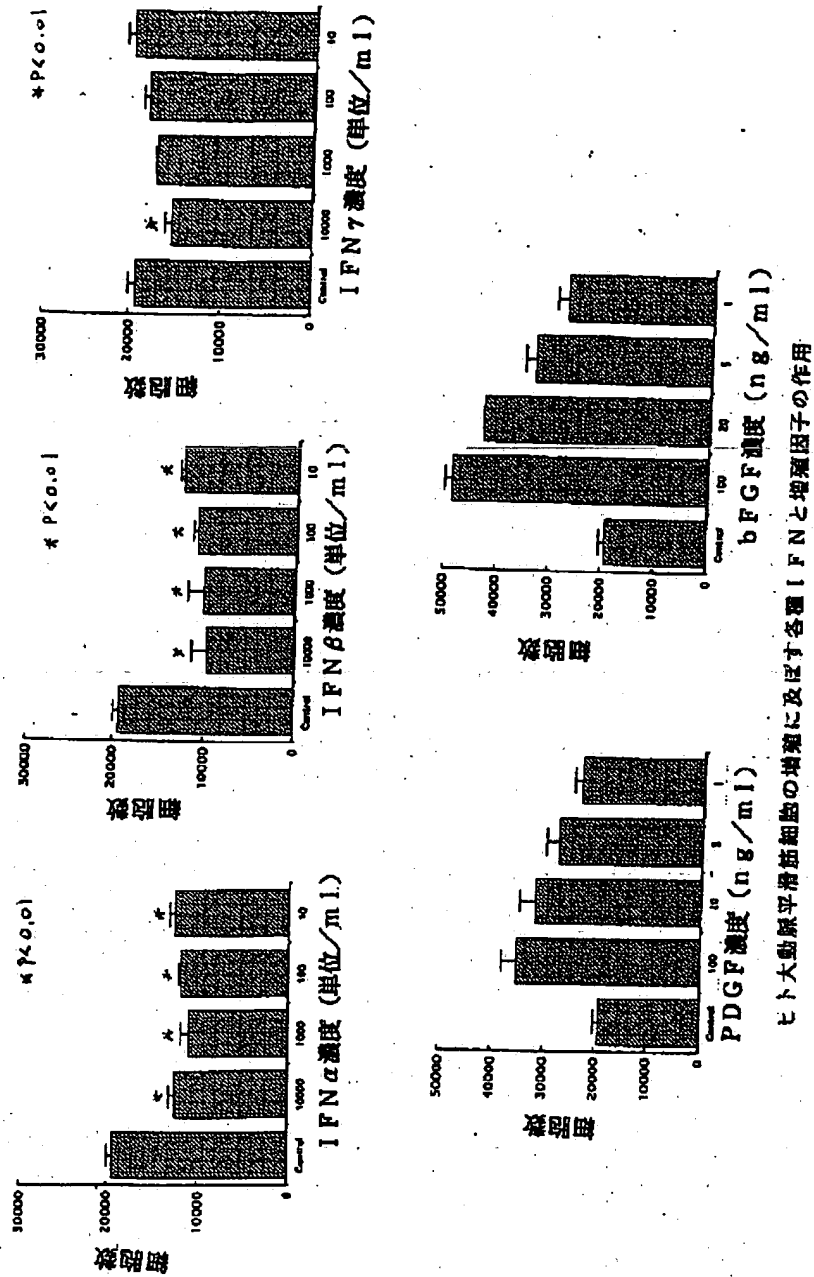
【発明の効果】本発明により、血管平滑筋細胞の異常増殖を原因とする様々な疾患、例えば、PTCA後の血管再狭窄、動脈硬化、虚血性血管障害後の内膜肥厚、末梢動脈閉塞、結節性動脈周囲炎、又は移植臓器において見られる血管炎などの細胞増殖性血管炎に対する予防薬、治療薬並びに血管壁肥厚抑制剤の提供が可能になる。

【図面の簡単な説明】

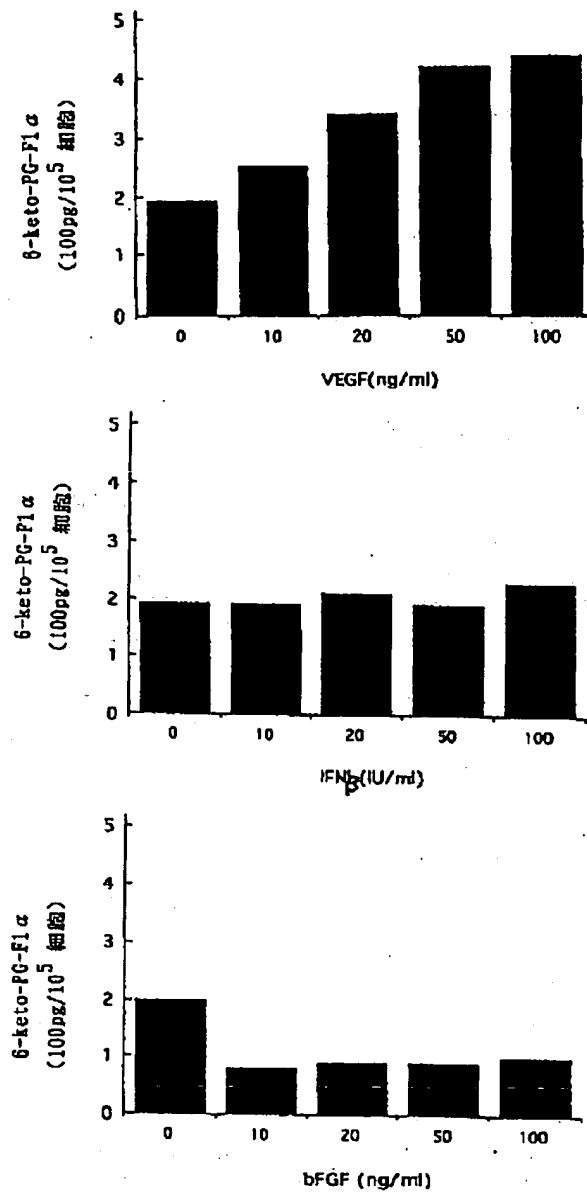
【図1】ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖に対する α 、 β および γ 型IFNと増殖因子(PDGFおよびbFGF)の作用を比較した図である。

【図2】内皮細胞のPGI₂(安定な6-Keto-PG-F1 α として測定)産生に及ぼすIFN β と増殖因子(VEGFおよびbFGF)の作用を比較した図である。

【図1】



【図2】



内皮細胞のPGI₂産生に及ぼすIFN β と各種増殖因子の作用